

# Indicadores de Prognóstico da Carcinogénese do Colo do Útero Associada à Infecção por Vírus do Papiloma Humano



## Biomarkers of Cervical Carcinogenesis Associated with Genital Human Papillomavirus Infection

Ana OLIVEIRA<sup>1</sup>, Candida DELGADO<sup>2</sup>, Nuno VERDASCA<sup>1</sup>, Angela PISTA<sup>1</sup>  
*Acta Med Port* 2013 Mar-Apr;26(2):139-144

### RESUMO

**Introdução/Objetivos:** A infeção persistente pelo Vírus do Papiloma Humano de alto risco (HPV<sub>ar</sub>) é considerada como a causa necessária, embora não suficiente, para o desenvolvimento do cancro do colo do útero, sugerindo que outros fatores estarão envolvidos no processo de carcinogénese. Este estudo pretendeu avaliar indicadores de prognóstico da persistência da infeção por HPV, nomeadamente o estado físico e a carga viral dos HPV 16 e 18 e a superexpressão dos transcritos do RNAm dos HPV 16, 18, 31, 33 e 45, num grupo de mulheres com ou sem sintomatologia clínica e citopatológica.

**Material e Métodos:** Foram estudadas 378 alíquotas de células epiteliais congeladas pertencentes a utentes dos centros de saúde do Serviço Nacional de Saúde e de clínicas privadas, referenciadas para teste HPV, entre Janeiro de 2007 e Dezembro de 2010. De acordo com o diagnóstico citopatológico, foram definidos cinco grupos: normal, ASCUS, LSIL, HSIL e carcinoma invasivo do colo do útero. Para a determinação do estado físico do DNA e da carga viral dos HPV 16 e 18 foi utilizada metodologia de PCR em tempo real, e para a superexpressão dos transcritos dos oncogenes E6 e E7 o sistema comercial NucliSENS EasyQ HPV<sup>®</sup>. Os indicadores foram analisados em associação com os tipos de lesão do colo do útero. Para a análise estatística foi utilizado o programa informático SPSS versão 16.0 e o teste de Chi-Quadrado.

**Resultados:** Os resultados mostraram ausência de associação estatisticamente significativa entre a gravidade da lesão e o estado físico do DNA dos HPV 16 e 18. A superexpressão dos transcritos do RNAm E6/E7 e a carga viral dos HPV 16 e 18 aumentaram significativamente em função do grau da lesão.

**Conclusões:** Os resultados obtidos sugerem que a determinação do estado físico do DNA dos HPV 16 e 18, isoladamente, não constitui um indicador de prognóstico para o desenvolvimento e progressão das lesões. A superexpressão dos transcritos dos oncogenes E6 e E7 está associada à progressão das lesões do colo do útero e apresenta maior especificidade no diagnóstico precoce das lesões pré-malignas. A quantificação do DNA dos HPV<sub>ar</sub> pode ser um indicador promissor de prognóstico das lesões pré-neoplásicas do colo do útero.

**Palavras-chave:** Infecções por Papillomavirus; Marcadores Tumoriais; Neoplasia Intraepitelial Cervical; Neoplasias do Colo do Útero.

### ABSTRACT

**Introduction/Objective:** Persistent infection with high-risk human papillomavirus (HPV) types is a necessary cause for cervical cancer development. The aim of this study was to evaluate the significance of different molecular markers for cervical carcinogenesis, and to assess their association with cervical intraepithelial neoplasia.

**Materials and Methods:** 378 cervical samples from women attending to primary Health Clinics of the National Health Service and Gynaecological Outpatient Clinics and referred for HPV testing were analyzed between January 2007 and December 2010. According to cytological diagnosis, five groups were defined: normal, ASCUS, LSIL, HSIL, and ICC. For the determination of viral DNA physical status was performed by using a real-time PCR methodology, over expression of E6/E7 mRNA NASBA amplification was performed with the NucliSENS EasyQ HPV assay and viral load was determined by a real-time PCR. HPV status was studied in relation to lesion severity. Statistical analysis was performed with SPSS software 16.0 and Chi-Square test.

**Results:** No significant statistical differences were found between the physical status of HPV 16 or 18 and lesion severity. Overexpression of E6/E7 mRNA increased with lesion severity. Viral load was significantly associated with the development of cervical intraepithelial lesion.

**Conclusions:** Data suggests that viral integration for HPV 16 seems to be an early event on cervical carcinogenesis, not being suitable as a molecular marker. E6/E7 mRNA and viral load can be more valuable approaches to use as biomarkers in the prevention of cervical cancer development.

**Keywords:** Cervical Intraepithelial Neoplasia; Papillomavirus Infections; Uterine Cervical Neoplasms; Tumor Markers, Biological.

### INTRODUÇÃO

O cancro do colo do útero é a terceira neoplasia mais frequente na mulher a nível mundial.<sup>1</sup> Em Portugal, a incidência do cancro do colo do útero é de 12,2 e a taxa de mortalidade de 3,6 por 100 000.<sup>1</sup> A infeção genital pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) é uma das infeções sexualmente transmissíveis (IST) mais frequentes e as

estimativas apontam para a prevalência de 30-60% e maior incidência nas faixas etárias mais jovens.<sup>2</sup> A infeção do colo do útero pelo HPV está associada a manifestações clínicas diversas, desde as lesões benignas aos carcinomas invasivos.<sup>3</sup> De facto, cerca de 99,7% dos casos de cancro do colo do útero estão associados à infeção por este vírus.<sup>3</sup>

1. Departamento de Doenças Infecciosas. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. Lisboa. Portugal.

2 - Departamento de Bioinformática e Biologia Computacional. Instituto de Tecnologia Química e Biológica. Lisboa. Portugal.

Recebido: 18 de Outubro de 2012 - Aceite: 27 de Março de 2013 | Copyright © Ordem dos Médicos 2013

Apesar da maioria das infeções por HPV serem subclínicas e transitórias, uma pequena percentagem de casos progride para carcinoma invasivo do colo do útero, sendo o tipo de HPV o fator mais importante para este comportamento biológico diferencial.

Atualmente, foram já identificados mais de 120 tipos de HPV, dos quais cerca de 45 infetam a mucosa genital. De acordo, com os estudos epidemiológicos e filogenéticos, e com base no potencial oncogénico que apresentam, os HPV genitais podem ser classificados em alto risco (HPV: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59), possível ou provável alto risco (HPV: HPV 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 e 82), baixo risco (HPV: HPV 6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 e 89) e risco indeterminado (HPV 2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 55, 62, 69, 71, 74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 90 e 91).<sup>4,5</sup>

A infeção persistente por HPV é considerada como uma causa necessária, embora não suficiente, para o desenvolvimento do cancro do colo do útero, sugerindo que outros fatores estarão envolvidos no processo de carcinogénese.

A disrupção ao nível do gene E2 dos HPV conduz à linearização do genoma viral e à superexpressão dos transcritos dos oncogenes E6 e E7 (RNAm E6/E7). Em excesso, as oncoproteínas E6 e E7 interagem com as proteínas celulares p53 e pRB e promovem a instabilidade genómica das células infetadas.<sup>6,7</sup> Paralelamente, pode ocorrer integração do DNA no genoma da célula hospedeira, considerada como pré-requisito para o processo de carcinogénese.<sup>8</sup> Assim, a identificação do estado físico do DNA, na forma episomal ou linear, e a deteção da superexpressão dos transcritos dos oncogenes virais E6 e E7, nomeadamente dos HPV 16, 18, 31, 33 e 45, são importantes indicadores da carcinogénese e fornecem informações úteis sobre o risco de progressão e/ou transformação maligna das células infetadas do colo do útero. De facto, a persistência da superexpressão do RNAm E6/E7 pode ser um dos indicadores e dos fatores mais significativos do processo de carcinogénese.

Vários estudos têm demonstrado que a carga viral influencia o valor preditivo, sendo observada a associação entre o aumento da carga viral, a persistência da infeção e o grau das lesões.<sup>9-11</sup> As lesões de baixo grau apresentam um risco 60 vezes maior de progredir para lesão pré-maligna, caso seja detetada uma carga viral elevada.<sup>12</sup> Contudo, apesar das avaliações realizadas, na Europa e na América do Norte,<sup>13,14</sup> a correlação entre a carga viral e a gravidade da lesão ainda não está esclarecida.

Com base nos pressupostos anteriores, este estudo pretendeu avaliar alguns indicadores de prognóstico da persistência da infeção por HPV, nomeadamente o estado físico e a carga viral dos HPV 16 e 18 e a superexpressão dos transcritos do RNAm dos HPV 16, 18, 31, 33 e 45, numa amostra de mulheres com ou sem sintomatologia clínica e citopatológica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### População

Foram incluídas neste estudo 378 mulheres residentes em Portugal, com idades compreendidas entre 18 - 71 anos (média = 34,3 ± 10,4; mediana = 32). Os casos em estudo foram aleatoriamente selecionados a partir de utentes dos centros de saúde do Serviço Nacional de Saúde e de clínicas privadas, referenciadas para teste HPV, entre Janeiro de 2007 e Dezembro de 2010. Nenhuma colheita ginecológica foi realizada exclusivamente para o projeto em questão. Utilizaram-se as aliquotas de células epiteliais congeladas, que previamente foram analisadas para a deteção do HPV 16, 18, 31, 33 e 45.

De acordo com o diagnóstico citopatológico foram definidos os seguintes grupos: normal (classificação baseada na observação clínica, citológica e colposcópica normal), ASCUS (atípia de significado indeterminado), LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial de alto grau) e carcinoma invasivo do colo do útero.

### Avaliação da Integração do DNA dos HPV 16 e 18

Foi utilizado o procedimento experimental descrito por Huang e colaboradores,<sup>15</sup> que consiste numa PCR *single-plex* em tempo real com o sistema SYBR® GreenER™ (Invitrogen, Califórnia, EUA) e com *primers* específicos para os genes E2 e E6 dos HPV 16 e 18.

O estado físico do DNA do HPV 16 e 18 foi determinado a partir do cálculo da razão entre o produto amplificado do gene E2 e o produto amplificado do gene E6 (E2/E6).

Se E2/E6 for igual ou superior a 1, considera-se que o DNA viral está na forma episomal, e se E2/E6 for inferior a 1, considera-se que o DNA viral está na forma concomitante (presença das formas episomal e linear) ou linear.

### Deteção de Infeções Persistentes por Análise dos Transcritos do RNAm

Para a extração, amplificação e deteção dos transcritos do RNAm E6/E7 dos HPV 16, 18, 31, 33 e 45 foi utilizado o sistema comercial NucliSENS EasyQ HPV® (bioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, França), de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação e deteção do RNAm E6/E7 consiste numa reação NASBA, com deteção qualitativa de transcritos do RNAm e análise dos resultados através de um leitor específico.

### Quantificação do DNA viral dos HPV 16 e 18

Foi utilizado o procedimento experimental descrito por Carcopino e colaboradores,<sup>11</sup> que consiste numa PCR *duplex* em tempo real. Foram utilizados *primers* e sondas Taqman (Applied Biosystems; Califórnia, EUA) específicas para o gene E6 dos HPV 16 e 18, e para o exão 12 do gene da albumina humana.

A carga viral, expressa como o número de cópias de HPV por milhão de células humanas normais (células HPV/10<sup>6</sup> células humanas), foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

Carga viral = nº cópias HPV/(nº cópias albumina/2) x 10<sup>6</sup>.

## Análise Estatística

Foi utilizado o programa informático SPSS versão 16.0 (Statistical Package for Social Sciences; SPSS, Inc., Chicago, EUA). Recorreu-se ao teste de Chi-Quadrado ( $\chi^2$ ) para analisar a associação entre os diferentes marcadores moleculares em estudo e o desenvolvimento de lesões intraepiteliais. Os valores de  $p = 0,05$  foram definidos como nível de significância.

## RESULTADOS

### Avaliação da Integração do DNA dos HPV 16 e 18

Foram analisadas 65 mulheres, 44 com infeção por HPV 16 e 21 com infeção por HPV 18.

De acordo com o diagnóstico citológico, foram definidos quatro grupos: normal ( $n = 26$ ), ASCUS ( $n = 16$ ), LSIL ( $n = 16$ ) e HSIL ( $n = 7$ ).

O DNA do HPV 16 estava na forma epissomal em 23/44 (52,3%), na forma concomitante em 18/44 (40,9%) e na forma linear em 3/44 (6,8%) dos casos estudados (Fig. 1). De acordo com o diagnóstico citológico, em 14/20 (70,0%) das citologias normais, 3/11 (27,0%) dos ASCUS e 6/10 (60,0%) das lesões LSIL, o DNA do HPV 16 encontrava-se na forma epissomal. A forma concomitante foi identificada em 4/20 (20,0%) das citologias normais, 8/11 (73,0%) dos casos de ASCUS, 4/10 (40,0%) das lesões LSIL, e 2/3 (67,0%) das lesões HSIL, enquanto a forma linear foi detetada apenas nas citologias normais (2/20; 10,0%) e nas lesões pré-malignas (1/3; 33,0%).

Nos casos de infeção por HPV 18, 4/21 (19,0%) apresentavam o DNA viral na forma epissomal, 6/21 (28,6%) na forma concomitante e 11/21 (52,4%) na forma linear (Fig. 2). De acordo com o diagnóstico citológico, em 2/6 (33,3%) das citologias normais, 1/5 (20,0%) dos ASCUS, e 1/6 (17,0%) das lesões de baixo grau, o DNA do HPV 18

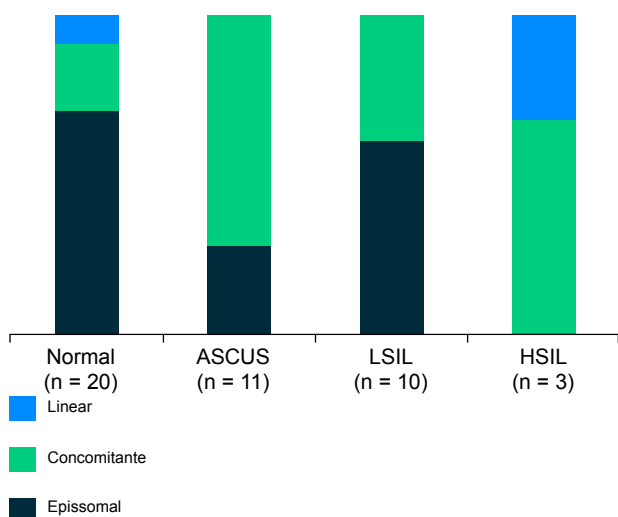
estava na forma epissomal. A forma concomitante foi identificada em 2/6 (33,3%) das citologias normais, 2/5 (40,0%) dos ASCUS, 1/6 (17,0%) das lesões LSIL e 1/4 (25,0%) das lesões HSIL, enquanto a forma linear foi detetada em 2/6 (33,3%) das citologias normais, 2/5 (40,0%) dos ASCUS, 4/6 (67,0%) das lesões LSIL, e 3/4 (75,0%) das lesões HSIL.

Não foi identificada nenhuma associação estatisticamente significativa entre a gravidade das lesões e o estado físico do DNA dos HPV 16 ( $p = 0,108$ ) e HPV 18 ( $p = 0,783$ ).

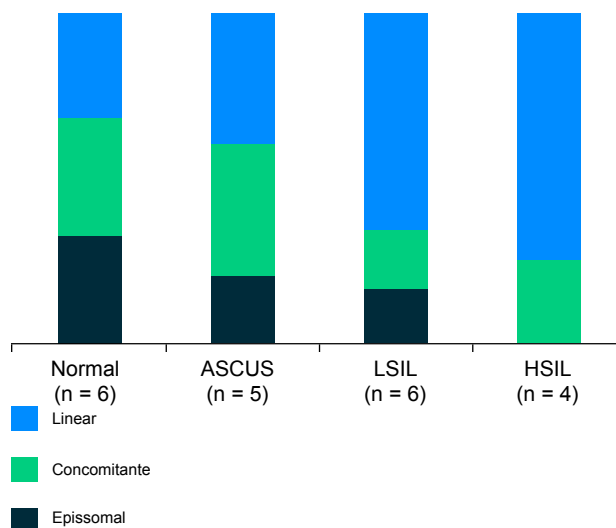
### Deteção de Infecções Persistentes por Análise dos Transcritos do RNAm

Foram estudados 299 casos de infeções simples e mistas por HPV 16, 18, 31, 33 e 45. Os casos com infeção por dois ou mais tipos de HPV em análise foram considerados individualmente ( $n = 349$ ). O RNAm E6/E7 foi detetado em 67,6% (236/349) dos casos (Tabela 1). A superexpressão dos transcritos de RNAm E6/E7 foi superior nas lesões HSIL (83/102) e nos casos de carcinoma invasivo (7/7). A superexpressão dos transcritos de RNAm E6/E7 do HPV 16 foi a mais frequente em todos os grupos citológicos, seguida da superexpressão do HPV 31 (8/77) nas citologias normais, do HPV 33 (7/53) nos ASC-US, do HPV 45 (2/17) nos ASC-H, do HPV 18 (9/73) nas lesões LSIL, e do HPV 31 (7/102) nas lesões HSIL. Nos casos de carcinoma invasivo do colo do útero apenas foi detetado o RNAm E6/E7 dos HPV 16 (3/7), HPV 18 (3/7) e HPV 31 (1/7) (Tabela 1).

Para avaliar a persistência da superexpressão do RNAm E6/E7 foram analisadas 61 mulheres, seguidas durante um período de 18 meses e com avaliação a cada seis meses. Destas, 7/61 (11,5%) () tiveram o teste de RNAm E6/E7 negativo ao fim de 6 a 18 meses, o que significa que a infeção por HPV foi eliminada. Das restantes 54 mulheres sob vigilância clínica, 16 apresentaram o teste de



**Figura 1** – Representação gráfica do estado físico do DNA do HPV 16, em função do diagnóstico citopatológico ( $n = 44$ ). Normal, observação citológica normal; ASCUS, atípia de significado indeterminado; LSIL, lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL, lesão intraepitelial de alto grau.



**Figura 2** – Representação gráfica do estado físico do DNA do HPV 18, em função do diagnóstico citopatológico ( $n = 21$ ). Normal, observação citológica normal; ASCUS, atípia de significado indeterminado; LSIL, lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL, lesão intraepitelial de alto grau.

Tabela 1: Distribuição da superexpressão dos transcritos dos oncogenes E6 e E7, de acordo com o diagnóstico citopatológico

RNA <sub>m</sub> (%)	Normal (n = 77)	ASC-US (n = 53)	ASC-H (n = 17)	LSIL (n = 73)	HSIL (n = 102)	Carcinoma (n = 7)	ND (n = 20)	Total (n = 349)
<b>HPV 16 (n = 190)</b>								
RNA <sub>m</sub> -vo	14 (18,2)	5 (9,4)	2 (11,8)	11 (15,1)	7 (6,9)	0	3 (15,0)	42 (12,0)
RNA <sub>m</sub> +vo	23 (29,9)	19 (35,8)	8 (47,1)	26 (35,6)	61 (59,8)	3 (42,9)	8 (40,0)	148 (42,4)
<b>HPV 18 (n = 36)</b>								
RNA <sub>m</sub> -vo	5 (6,5)	2 (3,8)	0	2 (2,8)	1 (1,0)	0	1 (5,0)	11 (3,2)
RNA <sub>m</sub> +vo	3 (3,9)	4 (7,5)	1 (5,9)	9 (12,3)	5 (4,9)	3 (42,9)	0	25 (7,2)
<b>HPV 31 (n = 75)</b>								
RNA <sub>m</sub> -vo	15 (19,5)	6 (11,3)	2 (11,8)	10 (13,7)	7 (6,9)	0	3 (15,0)	43 (12,3)
RNA <sub>m</sub> +vo	8 (10,4)	5 (9,4)	0	7 (9,6)	7 (6,9)	1 (14,2)	4 (20,0)	32 (9,2)
<b>HPV 33 (n = 28)</b>								
RNA <sub>m</sub> -vo	3 (3,9)	2 (3,8)	1 (5,9)	1 (1,4)	3 (2,9)	0	1 (5,0)	11 (3,2)
RNA <sub>m</sub> +vo	0	7 (13,2)	1 (5,9)	4 (5,5)	5 (4,9)	0	0	17 (4,9)
<b>HPV 45 (n = 17)</b>								
RNA <sub>m</sub> -vo	2 (2,6)	2 (3,8)	0	1 (1,4)	1 (1,0)	0	0	6 (1,8)
RNA <sub>m</sub> +vo	4 (5,2)	1 (1,9)	2 (11,8)	2 (2,8)	5 (4,9)	0	0	14 (4,0)
<b>Total RNA<sub>m</sub> -vo</b>	<b>39 (50,6)</b>	<b>17 (32,1)</b>	<b>5 (29,4)</b>	<b>25 (34,2)</b>	<b>19 (18,6)</b>	<b>0</b>	<b>8 (40,0)</b>	<b>113 (32,4)</b>
<b>Total RNA<sub>m</sub> +vo</b>	<b>38 (49,4)</b>	<b>36 (67,9)</b>	<b>12 (70,6)</b>	<b>48 (65,8)</b>	<b>83 (81,4)</b>	<b>7 (100)</b>	<b>12 (60,0)</b>	<b>236 (67,6)</b>
<b>Valor de p</b>	<b>-</b>	<b>0,000</b>	<b>0,327</b>	<b>0,438</b>	<b>0,327</b>	<b>0,000</b>		<b>0,003</b>

Normal, observação citológica normal; ASC-US, atipia de significado indeterminado; ASC-H, atipia de significado indeterminado, não podendo excluir lesão de gravidade superior; LSIL, lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL, lesão intraepitelial de alto grau; ND, sem informação disponível; RNA<sub>m</sub> -vo, casos negativos para o RNA<sub>m</sub> E6/E7; RNA<sub>m</sub> +vo, casos positivos para o RNA<sub>m</sub> E6/E7; p, probabilidade de significância.

RNA<sub>m</sub> E6/E7 negativo ao fim de 6 meses, na sequência do tratamento por conização de lesões pré-malignas. Das 38 mulheres em que a superexpressão dos oncogenes E6/E7 persistiu, nove tinham sido submetidas a tratamento. Nas 29 mulheres não submetidas a tratamento, foi observada uma progressão das lesões em 23.

#### Quantificação do DNA viral dos HPV 16 e 18

Foram avaliados 131 casos de infecção por HPV 16, dos quais 84 correspondiam a infecções simples. De acordo com o diagnóstico citopatológico, foram definidos cinco grupos: normal (n = 46), ASCUS (n = 24), LSIL (n = 34), HSIL (n = 25) e carcinoma invasivo do colo do útero (n = 2).

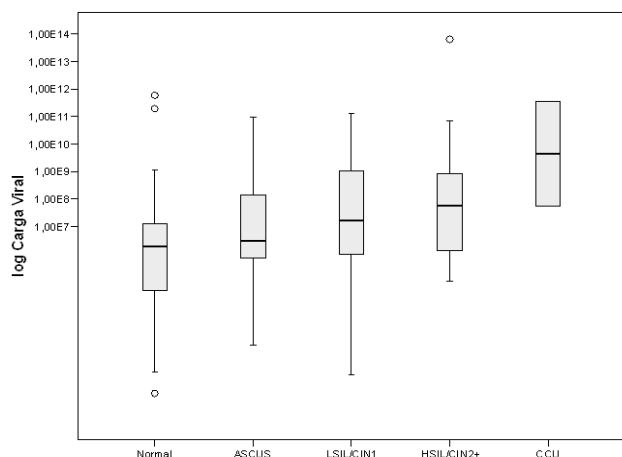
Para o HPV 18, foram estudados 60 casos, dos quais 33 apresentavam infecções simples, agrupados de acordo com o diagnóstico citopatológico em normal (n = 20), ASCUS (n = 19), LSIL (n = 13), HSIL (n = 5) e carcinoma invasivo do colo do útero (n = 3).

Os resultados obtidos para o HPV 16 permitiram identificar diferenças significativas entre a quantificação do DNA viral e a gravidade da lesão (Fig. 3). Nos casos de infecção por HPV 18, de acordo com o diagnóstico citopatológico foi possível observar que os valores da carga viral aumenta-

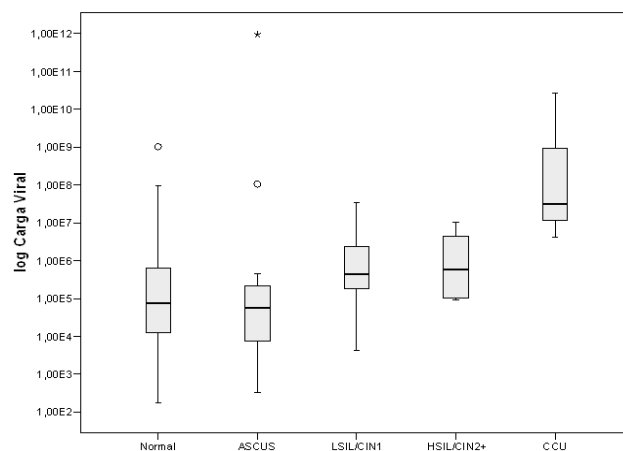
ram significativamente em função do grau da lesão, o que sugere uma relação semelhante à identificada para o HPV 16 (Fig. 4).

Os valores médios da carga viral do HPV 16 e do HPV 18 foram significativamente mais elevados nas lesões pré-malignas do que nas lesões de baixo grau (p = 0,049 e p = 0,001, respetivamente), nomeadamente nos casos das mulheres do grupo etário entre os 31 e os 40 anos. Foram ainda estudados oito casos de infecção por HPV 16+18, onde se constatou que a determinação da carga viral era da mesma ordem de grandeza logarítmica para os dois genótipos.

Nas mulheres submetidas a vigilância clínica, após tratamento das lesões pré-malignas por conização, em 8/191 dos casos foi detetada elevada carga viral para os HPV 16 e 18, o que sugere a identificação de infecções persistentes. Nestes casos, o valor de carga viral manteve ou aumentou, na mesma ordem de grandeza logarítmica. Por outro lado, foi também possível a identificação de infecções transitórias em 7/191 dos casos), confirmadas pela ausência de DNA viral nos 6 a 12 meses seguintes.



**Figura 3** – Gráfico do logaritmo da carga viral do HPV 16. Normal, observação citológica normal; ASCUS, atípia de significado indeterminado; LSIL/CIN1, lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL/CIN2+, lesão intraepitelial de alto grau; CCU, carcinoma invasivo do colo do útero; °, outliers.



**Figura 4** – Gráfico do logaritmo da carga viral do HPV 18 em função do diagnóstico citopatológico. Normal, observação citológica normal; ASCUS, atípia de significado indeterminado; LSIL/CIN1, lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL/CIN2+, lesão intraepitelial de alto grau; CCU, carcinoma invasivo do colo do útero; ° \*, outliers.

## DISCUSSÃO

Atualmente, é aceite que a integração do DNA do HPV no genoma da célula hospedeira é essencial para o processo de transformação maligna, sendo considerado como um mecanismo de ativação para a progressão às lesões pré-malignas.<sup>16</sup> No entanto, o valor de prognóstico do estudo da integridade do gene E2, para o desenvolvimento do cancro do colo do útero, tem sido controverso.<sup>17</sup> Existem estudos que permitiram identificar a presença de formas episomais do DNA do HPV 16 em casos de cancro do colo do útero, indicando aparentemente que no processo de transformação maligna a linearização do genoma pode não ocorrer em todas as cópias virais.<sup>18,19</sup>

Relativamente ao HPV 18, os estudos desenvolvidos demonstraram que a progressão para lesões pré-malignas ou cancro do colo do útero, pode ocorrer mais rapidamente quando detetado o DNA viral na forma linear.<sup>19</sup>

Os resultados obtidos neste estudo, sugerem que, de facto, a integração precoce do DNA do HPV 16 pode ocorrer, uma vez que foram encontradas formas concomitantes e lineares em casos de lesões de baixo grau e de citologia normal. A avaliação do estado físico do DNA do HPV 18 permitiu identificar formas concomitantes e lineares em todos os grupos de diagnóstico citológico. No entanto, a presença destas formas aumentou em função da gravidade das lesões do colo do útero. Estes resultados foram concordantes com os dados descritos por outros autores.<sup>20-22</sup>

O potencial oncogénico dos HPV 16, 18, 31, 33 e 45 está relacionado com a atividade dos oncogenes E6/E7 e a respetiva interação com as proteínas celulares p53 e pRB, conduzindo ao aumento da instabilidade genómica e do risco de transformação maligna.<sup>23</sup> Assim, o teste do RNAm E6/E7, ao identificar a superexpressão persistente dos transcritos dos oncogenes virais, assume um papel impor-

tante no prognóstico da evolução e progressão das lesões de baixo grau.<sup>24</sup> Considera-se que o teste do RNAm E6/E7 apresenta um valor preditivo positivo mais elevado que os métodos de deteção e tipificação do DNA, que apenas evidenciam a persistência da infeção por HPV.<sup>24-26</sup>

O RNAm E6/E7 foi detetado em 67,6% dos casos estudados. De acordo com o diagnóstico citopatológico, foi observada uma associação estatisticamente significativa entre a expressão do RNAm e a gravidade da lesão ( $p = 0,003$ ; 81,4% nas lesões HSIL *versus* 49,4% nas citologias normais), o que está de acordo com o demonstrado por outros estudos.<sup>24,25,27</sup>

Os resultados do estudo dos casos de seguimento sugerem que, nas mulheres que apresentam o diagnóstico citológico de lesões de baixo grau, a deteção da superexpressão dos transcritos do RNAm E6/E7 pode ser considerada um importante indicador de prognóstico, evitando tratamentos desnecessários e melhorando os cuidados de saúde que são prestados à mulher.<sup>25,28</sup>

Nestas situações, o teste de RNAm E6/E7 apresenta maior especificidade no diagnóstico precoce das lesões pré-malignas, funcionando como um teste de segunda linha. A persistência da superexpressão dos oncogenes E6/E7 observada em 15,8% das mulheres submetidas a tratamento indicia que o mesmo é eficaz na eliminação da lesão mas não na eliminação da infeção. No entanto, o facto do teste RNAm E6/E7 apenas avaliar a superexpressão dos oncogenes de cinco tipos de HPV, poderá diminuir a sensibilidade clínica.

Tem sido demonstrado que a determinação da carga viral pode ser um bom indicador de prognóstico para o desenvolvimento de cancro do colo do útero, pois cargas virais elevadas podem indicar a replicação ativa, estando na origem da persistência viral.<sup>29</sup> No presente estudo, os valo-



res obtidos no grupo das citologias normais foram os mais heterogêneos, tendo-se observado, inclusive, o maior valor de carga viral. Para este grupo em particular, a análise dos vários parâmetros (diagnóstico citológico, infecção por HPV e quantificação do DNA) parece sugerir a ocorrência de um resultado falso negativo ou a desconformidade no diagnóstico citológico. A mesma justificação pode ser utilizada para explicar um caso de ASCUS, em que a carga viral do DNA do HPV 16 foi de  $9,3 \times 10^{10}$ . Excluindo estes casos, e tendo em conta os valores medianos, verificou-se que a carga viral aumenta em função do grau da lesão, o que é concorde com o conhecimento geral.<sup>9,11</sup>

De acordo com o esquema desenvolvido por Snidjers et al,<sup>29</sup> os resultados obtidos demonstraram que em 36/66 das citologias normais estudadas com infecção por HPV 16 poderá ocorrer progressão (carga viral  $> 10^5$ ). Em relação aos casos considerados como ASCUS, e, tendo em conta os resultados obtidos para a quantificação do DNA viral, 21/43 dos casos tenderão a regredir, com posterior eliminação da infecção por HPV 16 e/ou 18.

## REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127:2893-917.
2. Burchell AN, Winer RL, De Sanjose S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*. 2006;24(Suppl 3):53-61.
3. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189:12-9.
4. Munoz N, Castellsagué X, De González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24(Suppl 3):1-10.
5. IARC Monograph Working Group. Special Report: Policy. A review of human carcinogens – Part B: biological agents. *Lancet*. 2009;10:321-2.
6. Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther*. 2002;7:219-37.
7. Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*. 2004;109:157-62.
8. Gallo G, Bibbo M, Bagella L, Zamparelli A, Sanseverino F, Giovagnoli MR, et al. Study of viral integration of HPV 16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol*. 2003;56:532-6.
9. Cuzick J, Terry G, Ho L, Hollingworth T, Anderson M. Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer*. 1994;69:167-71.
10. Abba MC, Villaverde LM, Gomez MA, Dulout FN, Laguens MR, Golijow CD. The p53 codon 72 genotypes in HPV infection and cervical disease. *Eur J Obstet Gynecol Reproduct Biol*. 2003;109:63-6.
11. Carcopino X, Henry M, Benmoura D, Fallabregues AS, Richet H, Boublil L, et al. Determination of HPV type 16 and 18 viral load in cervical smears of women referred to colposcopy. *J Med Virol*. 2006;78:1131-40.
12. Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent dysplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:1365-71.
13. Cuzick J, Terry G, Ho L, Hollingworth T, Anderson M. HPV in cervical smears. *Lancet*. 1992;340:112-13.
14. Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sørensen P, Qvarforth-Tubbin P, Andersen PK, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma *in situ*: a nested-case-control study. *Lancet*. 2000;355:2189-93.
15. Huang LW, Chao SL, Lee BH. Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervical carcinogenesis. *J Clin Pathol*. 2008;61:627-31.
16. Vernon SD, Unger ER, Miller DL, Lee DR, Reeves WC. Association of human papillomavirus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer. *Int J Cancer*. 1997;74:50-6.
17. Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johanson B. Disruption of E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinomas is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol*. 1998;17:146-53.
18. Das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, Luthra UK. Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol*. 1992;73:2327-36.
19. Badaracco G, Vvenuti A, Sedati A, Marcante ML. HPV 16 and HPV 18 in genital tumours: significantly different levels of viral integration and correlation to tumour invasiveness. *J Med Virol*. 2002;67:574-82.
20. Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllenstein U, Johansson B. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer*. 2005;92:2195-200.
21. Ho CM, Chien TY, Huang SH, Lee BH, Chang SF. Integrated human papillomavirus types 52 and 58 are infrequently found in cervical cancer, and high viral loads predict risk of cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2006;102:54-60.
22. Qiu AD, Wu EQ, Yu XH, Jiang CL, Jin YH, Wu YG, et al. HPV prevalence, E6 sequence variation and physical state of HPV16 isolates from patients with cervical cancer in Sichuan, China. *Gynecol Oncol*. 2007;104:77-85.
23. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 2002;89:213-28.
24. Molden T, Nygard JF, Kraus I, Karlsen F, Nygard M, Skare GB, et al. Predicting CIN 2+ when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-Proofer and consensus PCR: a 2-year follow-up of women with ASC-US or LSIL Pap Smear. *Int J Cancer*. 2005;114:973-6.
25. Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence - implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol*. 2004;73:65-70.
26. Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Nygård JF, Hagmar B. Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a two year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:367-72.
27. Mockel J, Clad A, Endres A-S, Schneider V. HPV E6/E7 mRNA transcripts as predictors of high-grade epithelial cervix dysplasia. *Diagn Pathol*. 2007;2:S1.
28. Lie AK, Risberg B, Borge B, Sandstad B, Delabie J, Rimala R, et al. DNA-versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2005;97:908-15.
29. Snidjers PJF, van der Brule AJC, Meijer CJLM. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol*. 2003;201:1-6.

## CONCLUSÕES

Em resumo, os resultados obtidos sugerem que por só a determinação do estado físico do DNA dos HPV 16 e 18 não é um bom indicador de prognóstico para o desenvolvimento e progressão das lesões. A superexpressão dos oncogenes E6/E7 está associada à progressão das lesões do colo do útero e apresenta maior especificidade no diagnóstico precoce das lesões pré-malignas. No entanto, o valor preditivo do teste de RNAm E6/E7 varia em função do tipo de HPV. A quantificação do DNA dos HPV parece ser um dos indicadores de prognóstico mais promissores.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não existir qualquer conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

## FONTES DE FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado pela Bolsa de investigação da Fundação Calouste Gulbenkian (Ref. 96507) e da Comissão de Fomento de Investigação em Cuidados de Saúde (Ref. 13374), cujo investigador principal era A Pista.